

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۲ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۸۹ صفحات ۵۶-۵۱

ارتباط بین مقادیر بیلی روبین و آلفا فتوپروتئین سرمی در ۱۰۰ نوزاد مبتلا به هیپر بیلی روبینمی

فرهاد صالح زاده: گروه اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

سحر ابو الفتحی: پزشک عمومی

حسین علیمحمدی: دکترای میکروبیولوژی

مهرداد میرزاحیمی: استادیار گروه اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، نویسنده مسئول:

Email: mmirzarahimi@yahoo.com

سپیده جهانگیری: پزشک عمومی، مدیر گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

طاہره حاجی زاده: پزشک عمومی

افشان شرقی: پزشک عمومی

چکیده

زمینه و هدف: یکی از بیماریهایی که در نوزادان در اولین روزهای بعد از تولد عارض می شود زردی است که به علت تجمع بیلی روبین می باشد. AFP (Alpha – Fetoprotein) پروتئینی است که در دوران جنینی از کیسه زرده و کبد ترشح شده و نقشهای فیزیولوژیک زیادی دارد و مقدار آن در دوران بارداری افزایش و بعد از تولد مقدار آن به سرعت کاهش می یابد.

در این مطالعه ارتباط بین مقدار AFP و هایپر بیلی روبینمی در ۱۰۰ نوزاد طبیعی مبتلا به زردی بررسی شده است.

روش کار: در این مطالعه مقطعی، ۱۰۰ نوزاد ترم سالم با علائم زردی پاتولوژیک به روش نمونه گیری در دسترس وارد مطالعه شدند همگی کمتر از ۲۸ روز سن داشتند. کلیه نوزادان زردی فیزیولوژیک تشدید شده داشته و جهت فتوتراپی بستری شده بودند و در صورت داشتن علائم دیگر مثل سپسیس از مطالعه حذف شدند. بعد از تکمیل کردن چک لیست مقادیر بیلی روبین و AFP همزمان اندازه گیری شد و نتایج بوسیله نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها: ۶۶ پسر و ۳۴ نوزاد دختر وارد مطالعه شدند. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین AFP و متغیرهای سن، جنس، گروه های خونی و وزن زمان تولد نوزادان یافت نشد. همچنین با استفاده از آزمون همبستگی پیر سون هیچ ارتباط خطی معنی داری بین مقادیر AFP و بیلی روبین توتال در نوزادان به دست نیامد. ($r = 0/016$).

نتیجه گیری: هیچ ارتباط معنی داری بین مقادیر سرمی AFP و بیلی روبین، سن، جنس، وزن زمان تولد، گروه خونی نوزاد وجود نداشت.

کلید واژه ها: آلفا فتوپروتئین، ایکتر نوزادی، بیلی روبین، هایپر بیلی روبینمی.

مقدمه

متابولیسم بیلی روبین نوزادان در بدو تولد در تبدیل از فرم جنینی که در طی آن جفت مسیر اصلی حذف بیلی روبین محلول در چربیهاست به حالت بلوغ که در طی آن بیلی روبین کتوگه و محلول در آب از سلولهای کبدی به داخل سیستم صفراوی ترشح و پس از آن وارد دستگاه گوارش می شود قرار دارد (۱و۲).

بیلی روبین و بیلی وردین از یک طرف توانایی آنتی اکسیدان دارند و سلولها را از استرس اکسیداتیو محافظت می کنند ولی از طرف دیگر بیلی روبین اثر نورو توکسیک هم دارد (۳). یکی از عوارض هایپر بیلی روبینمی کرنیکتروس می باشد. کرنیکتروس یا آنسفالوپاتی بیلی روبین یک سندرم نورو لوزیک

با توجه به اهمیت بیوفیزیکی AFP و نقش انتقالی و حفاظتی آن و احتمال ارتباط آن با مقادیر بیلیروبین سرم در نوزادی مطالعاتی صورت گرفته است.

در برخی مطالعات مقادیر AFP با جنسیت نوزادان تفاوتی نشان نداده است (۳۰ و ۳۱) ولی در برخی مطالعات مقادیر آن در جنس مذکر بیشتر بوده است (۳۲ و ۳۳).

در مطالعاتی ارتباط بین AFP و وزن زمان تولد نوزاد بررسی شده است، که این ارتباط معنی دار بود و نشان داده شده است که با افزایش وزن تولد میزان AFP کاهش می یابد (۳۰ و ۳۱).

در یک مطالعه میزان AFP سرمی در ۱۵ نوزاد دچار زردی و هیپربیلیروبینمی در مقایسه با ۱۵ نوزاد گروه کنترل نشان داد که مقادیر AFP سرمی در گروه زردی دو برابر گروه کنترل بوده است ولی هیچ ارتباط معنی داری بین مقادیر AFP و بیلیروبین سرم یافت نشد (۳۴). اخیراً در مطالعاتی به این ارتباط مجدداً به عنوان روش غربالگری توجه شده است (۳۵).

با توجه به اینکه AFP پروتئین شبه آلبومین بوده و توانایی باند شدن به بیلیروبین را دارد و همچنین اثرات حفاظتی روی سیستم عصبی و نورونها برای آن تصور می گردد، این مطالعه بر اساس ارزیابی همزمان مقادیر بیلیروبین و AFP در خون نوزاد و بررسی احتمال ارتباط بین آن دو طرح ریزی گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مقطعی توصیفی - تحلیلی بوده که در مرکز آموزشی درمانی کودکان اردبیل انجام شد. تعداد ۱۰۰ نوزاد ترم مبتلا به زردی که هیچ نشانه‌ای از نقص آناتومیک، ناهنجاری مادرزادی، سیتیسمی، بیماری متابولیک نداشته و صرفاً جهت فتوتراپی بعلت بیلیروبین بالا بستری بودند، به روش نمونه گیری در دسترس وارد مطالعه شدند. حجم نمونه مورد نیاز با استفاده از فرمول محاسبه حجم نمونه در مطالعات همبستگی و با در نظر گرفتن مقدار ۰/۳ بعنوان کمترین ضریب همبستگی مورد انتظار، به تعداد ۹۱ نفر برآورد گردید. همچنین از والدین نوزادان برای اخذ نمونه رضایت کسب شد و از هر کودک ۲ میلی لیتر خون گرفته شد. جهت سنجش AFP از کیت اندازه گیری AFP، CanAg، سوئد استفاده شد. روش اندازه گیری کیت، (Enzyme Immune Assay) استفاده است. از تکنیک ساندویچ مستقیم (Direct Sandwich technique) در مکانیسم اندازه گیری AFP در این کیت استفاده شده است (۳۶-۳۷). از دستگاه Stat fax مدل ۳۰۳ ساخت آمریکا، بعنوان دستگاه الیزا برای سنجش جذب نوری (Absorbance) تستهای انجام گرفته استفاده گردید. نحوه انجام آزمایش بر اساس روش متداول کالیمتریک - اسپکتروفتومتری Diazotization بود. آنالیز داده ها با نرم افزار آماری SPSS-13 و با آزمونهای ضریب همبستگی پیرسون، ANOVA، نان پارامتریک و t مستقل انجام شد. در تمامی مراحل $P = 0/05$ معنی دار تلقی گردید.

است که در نتیجه رسوب بیلیروبین غیر کنژوگه در هسته های قاعده ای و هسته های ساقه مغزی ایجاد می شود (۱).

Alpha - Fetoprotein (AFP) یک پروتئین مازور از پلاسمای جنینی می باشد (۵۴). این گلیکوپروتئین بزرگ با توده مولکولی در حدود ۶۸ KDa شامل یک زنجیره پلی پپتیدی تکی مشتمل بر ۵۹۰ قسمت آمینواسیدی می باشد (۶) و متعلق به خانواده پروتئین های شبه آلبومینی هستند که این خانواده شامل پروتئین باند شونده به ویتامین L-Albumin، D و HSA (Human Serum Albumin) نیز می باشد (۷).

AFP بوسیله کیسه زرده و کبد جنین تولید می شود. در حدود سن ۱۲ هفتگی کیسه زرده دژنره شده و کبد جنین محل اصلی سنتز AFP می شود. غلظت این پروتئین در جنین بسیار بالاست (۱-۱۰ mg/ml)، اما بعد از تولد مقدار آن کاهش یافته و در پایان ماه دوم فقط مقدار کمی از AFP قابل سنجش می باشد و اغلب بطور کامل بوسیله آلبومین سرم جایگزین می شود (۴ و ۷). ثابت شده است که تغییرات در محتوای AFP در طول حاملگی می تواند برای تشخیص ناهنجاریهای جنین شامل سندرم داون، لوله عصبی باز و نقص هایی نظیر اسپاینایفیدا بکار رود (۷-۱۱).

افزایش قابل ملاحظه AFP در پلاسمای بالغین یک هال مارک شرایط پاتولوژیکی مختلف نظیر هپاتوسلولار کارسینوما و تومور کیسه زرده (۷-۱۲ و ۱۴) و بسیاری از انواع دیگر مثل هپاتیت، سیروز، هپاتوما، تراتوکارسینوما و بعضی تومورهای کلیوی و پانکراسی است (۱۵).

علاوه بر اهمیت تشخیصی AFP ثابت شده است که AFP یک تعداد فعالیت بیولوژیکی خیلی مهم نیز دارد که مهمترین آنها یک عملکرد انتقالی است (۱۶-۱۸). عملکرد مهم AFP ظرفیت باند شدن استروژنها به آن است که می تواند بعنوان حامل استروژن در خون عمل کند (۱۸-۲۰). بطور کلاسیک بنظر می رسد که عملکرد AFP جدا کردن استروژنهای در گردش برای محافظت مغز در حال تکامل جنس مونث از اثرات آنها می باشد (۲۱). بدلیل اینکه AFP داخل نورونها یافت می شود بدون اینکه بطور موضعی تولید شود، حدس زده می شود که AFP بیشتر از یک نقش پاسیو، محافظت نوروئی هم داشته باشد (۲۲ و ۲۳). در مطالعاتی دیگر نیز این نقش حفاظتی در مقابل اثرات استروژن نشان داده شده است (۲۴).

AFP علاوه بر باند شدن به استروژن، نظیر آلبومین قادر است به استروئیدهای دیگر مثل مواد آندوژن و اگزوژن نظیر اسیدهای چرب، بیلیروبین و عوامل دارویی مختلف باند شود، لذا ممکن است یک نقش انتقالی عمومی بازی کند (۲۵).

نقش AFP در فرکانس پاسخ ایمنی هم مورد بحث قرار گرفته است (۲۶ و ۲۷). همچنین پیشنهاد شده که AFP پروتئینی است که جنین را در مقابل سیستم ایمنی مادر محافظت می کند (۲۸ و ۲۹). احتمال داده می شود که AFP ممکن است بعنوان آلبومین جنینی عمل کند (۷).

یافته ها

۶۶ نوزاد پسر و ۳۴ نوزاد دختر وارد مطالعه شدند که شروع زردی آنها بین ۲ تا ۲۰ روزگی بود. حداقل بیلی روبین توتال 6 mg/dl و حداکثر میزان آن $31/5 \text{ mg/dl}$ بود ($4/34 \pm 17/9$ میلی گرم بر دسی لیتر). حداقل وزن نوزادان ۲۰۰۰ گرم و حداکثر وزن آنها ۵۰۰۰ گرم ($538/99 \pm 3156$) بود. حداقل شمارش رتیکولوسیت $0/3$ درصد و حداکثر آن ۶ درصد ($1/29 \pm 1/14$) بود. حداقل AFP $65 \mu\text{g/l}$ و حداکثر آن $1100 \mu\text{g/l}$ بود ($526/71 \pm 204/12 \mu\text{g/l}$). مطابق با جدول ۱ بیشترین تعداد بیماران مربوط به گروه ۲ یعنی ۱۰-۵ روزه بود. بر اساس آنالیز

جدول ۱: میانگین مقادیر AFP به تفکیک گروههای سنی

گروه سنی بر حسب روز	تعداد	میانگین AFP $\mu\text{g/l}$
۱-۴	۲۳	۵۱۸/۱
۵-۹	۵۰	۵۱۵/۴
۱۰-۱۴	۱۷	۵۳۰/۸
۱۵-۱۹	۵	۶۶۳/۲
بیشتر از ۲۰	۵	۵۲۷/۹

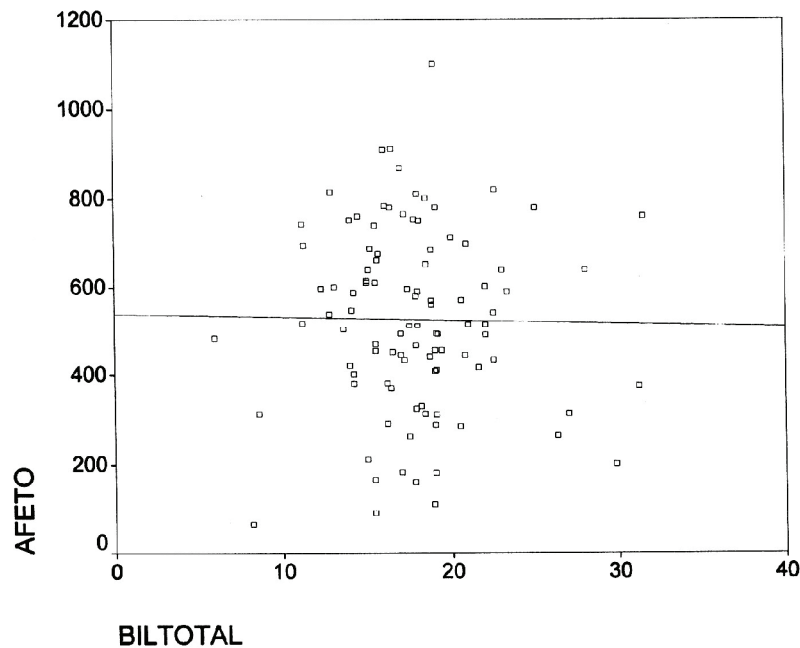
جدول ۲: مقایسه میانگین مقادیر AFP بر اساس متغیرهای مطالعه

متغیر	تعداد	انحراف معیار میانگین AFP	P value
مذکر	۶۶	$509/5 \pm 209/6$	
جنس			۰/۲۴
مونث	۳۴	$559/9 \pm 191/6$	
طبیعی	۵۸	$514/5 \pm 202$	
نوع زایمان			۰/۴۸
سزارین	۴۲	$543/5 \pm 208/3$	
گروههای خونی	۴۲	$615 \pm 233/3$	
	۱۹	$481/3 \pm 213/2$	
	۹	$650 \pm 210/5$	۰/۰۶
	۱۱	$590/8 \pm 183/7$	
کمتر از ۲۵۰۰	۱۱	$454/6 \pm 129/1$	
وزن موقع تولد	۸۴	$529/5 \pm 212/8$	۰/۲۴
بالای ۴۰۰۰	۵	$637 \pm 139/1$	

جدول ۳: تغییرات AFP و بیلی روبین

مقادیر بیلی روبین mg/dl	میانگین AFP $\mu\text{g/l}$	انحراف معیار	کمترین	بیشترین	محدوده
۰-۵	-	-	-	-	-
۵/۱-۱۰	۲۸۶/۳۳	۲۰۹/۲۷	۶۵	۴۸۱	۴۱۶
۱۰/۱-۱۵	۵۷۱/۷۲	۱۵۴/۲۸	۲۱۱	۸۱۵	۶۰۴
۱۵/۱-۲۰	۵۲۸/۲۹	۲۲۴/۴۳	۹۰	۱۱۰۰	۱۰۰۹/۴
۲۰/۱-۲۵	۵۵۳/۳۱	۱۳۶/۸۳	۲۸۵	۸۲۰	۵۳۵
۲۵/۱-۳۰	۳۵۵/۱	۱۹۵/۴۴	۲۰۱/۴	۶۴۰	۴۳۸/۶
بیشتر از ۳۰	۵۶۷/۵	۲۷۲/۲۳	۳۷۵	۷۶۰	۳۸۵

واریانس نان پارامتریک، میانگین مقادیر AFP در تمامی گروههای سنی یکسان بود و اختلاف آماری معنی داری بین مقادیر AFP در گروههای سنی وجود نداشت. در این مطالعه مقادیر AFP با جنس نوزاد، نحوه زایمان، گروههای خونی و وزن نوزادان، ارتباط آماری معنی داری نشان نداد (جدول ۲). در جدول ۳ تغییرات AFP و بیلی روبین توتال نمایش داده شده است. با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون، برای این تغییرات، ضریب همبستگی معادل $r = 0/016$ محاسبه گردید، که از نظر آماری معنی دار نبود. همچنین نمودار ۱، نیز عدم ارتباط خطی بین مقادیر AFP و بیلی روبین را نمایش می دهد.



نمودار ۱: پراکنش بین مقادیر AFP و مقادیر بیلی روبین

بحث

در این بررسی که روی ۱۰۰ نوزاد ترم مبتلا به زردی با بیلی-روبین های بالا در محدوده پاتولوژیک، بدون وجود هیچ مشکل زمینه‌ای، که صرفاً جهت دریافت فوتوتراپی در بیمارستان بستری شده بودند صورت گرفت.

در بررسی جنسی: ۶۶٪ نوزادان را جنس مذکر و ۳۴٪ آنها را جنس مونث تشکیل می‌دادند که برای جنس مذکر میانگین مقادیر AFP، $509/5 \mu g/l$ و برای جنس مونث $559/5 \mu g/l$ بدست آمد. مقایسه بین میانگین مقادیر AFP و جنسیت نشان داد که بین میانگین مقادیر AFP و جنسیت ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($P=0/24$) و این یافته مشابه مطالعات Carlo (۳۰) و گورایا Goraya (۳۱) می‌باشد.

ولی در یک مطالعه دیگر که توسط ابلیکو و همکاران انجام شد، مشخص گردید که میزان AFP سرمی نوزادان در جنس مذکر بیش از جنس مونث است (۳۲).

در یک مطالعه دیگر، که مقادیر AFP سرمی ۲۸۴ مورد شیرخوار سالم (که شامل ۱۱۳ مورد نوزاد ترم و ۱۷۱ مورد شیرخوار زیر یک سال بود) نشان داد که اختلاف جنسی معنی‌داری در مقادیر بالای AFP سرمی وجود دارد که مربوط به نوزادان پسر ۲-۴ روزه بود (۳۱) که این مطالعات با نتایج بررسی ما مغایرت داشتند.

در بررسی ما حداقل وزن زمان تولد نوزادان ۲۰۰۰ گرم و حداکثر آن ۵۰۰۰ بود. میانگین مقادیر AFP در وزن کمتر از ۲۵۰۰ گرم، $454/6 \mu g/l$ تا ۲۵۰۰ تا ۴۰۰۰ گرم، $529/5 \mu g/l$ و در بیشتر از ۴۰۰۰ گرم، $637 \mu g/l$ اندازه‌گیری شدند. هرچند مقادیر

بالای AFP سرمی نوزادان، مربوط به وزن ۴۰۰۰ گرم می‌باشد، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/24$).

در مطالعه‌ای که توسط Lee و همکاران انجام شده بود، ارتباط معنی‌داری بین وزن زمان تولد و مقادیر AFP سرمی نوزادان وجود نداشت (۳۸). که این مطالعه با نتایج بررسی ما هم‌خوانی داشت. ولی در مطالعه‌ای دیگر، بین مقادیر AFP و وزن زمان تولد ارتباط معنی‌داری وجود داشت بطوریکه با افزایش وزن زمان تولد، میزان AFP سرمی کاهش می‌یافت و این کاهش تا حدودی از الگوی خطی پیروی می‌کرد ($P=0/51$) (۳۰). طبق مطالعات گورایا و همکاران نیز ارتباط معنی‌داری بین مقادیر AFP سرمی و وزن زمان تولد وجود داشت (۳۱) که این مطالعات با نتایج ما مغایرت داشت. مقایسه میانگین مقادیر AFP به تفکیک شروع زردی نشان داد که ارتباط بین این دو از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P=0/1$). در بررسی ۸۲٪ از نوزادان دارای بیلی‌روبین بالای $15 mg/dl$ بودند. بررسی تغییرات مقادیر AFP و بیلی‌روبین نشان داد که همانند مطالعه Ikonen (۳۴) ارتباط آماری معنی‌داری بین این دو متغیر وجود ندارد ($P=0/87$).

نتیجه‌گیری

بطور خلاصه نتایج نشان داد که هیچ ارتباط معنی‌داری بین مقادیر AFP و بیلی‌روبین نوزاد، سن نوزاد، جنس نوزاد، وزن زمان تولد، زمان شروع زردی، روش زایمان و گروه خونی نوزادی وجود ندارد.

References:

1. American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Neonatal Hyperbilirubinemia. Neonatal jaundice and kernicterus. *Pediatrics* 2001; **108**: 763-765.
2. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee for Quality Improvement and Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Practice parameter: management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn. *Pediatrics* 1994; **94**: 558-565.
3. Shibahara S, Kitamuro T, Takahashi K. Heme degradation and human disease: Diversity is the soul of life. *Antioxid Redox Signal* 2002; **4**(4): 593-602.
4. Bergstrand CG, Czar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 1956; **8**(2): 174.
5. Ruoslahti E, Seppälä M. α -Fetoprotein in normal human serum, *Nature* 1972; **235**: 161-162.
6. Morinaga T, Sakai M, Wegmann G, Tamaoki T. Primary structure of human α -fetoprotein and mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 1983; **80**: 4604-4608.
7. Deutsch HF. Chemistry and biology of α -fetoprotein. *Adv Cancer Res* 1991; **56**: 253-312.
8. Seppälä M, Ruoslahti E. Alpha fetoprotein: Physiology and pathology during pregnancy and application to antenatal diagnosis. *J Perinat Med* 1973; **1**(2):104-113.
9. Brock DJ, Scrimgeour JB, Nelson MM. Amniotic fluid alpha fetoprotein measurements in the early prenatal diagnosis of central nervous system disorders. *Clin Genet* 1975; **7**: 163-169.
10. Seppälä M. Fetal pathophysiology of human alpha-fetoprotein. *Ann NY Acad Sci* 1975; **22**: 259, 59-73.
11. Ruoslahti E, Seppälä M. Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv Cancer Res* 1979; **29**: 275-346.
12. Abelev GI. α -Fetoprotein in angiogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res* 1971; **14**: 295-358.
13. Okuda K, Kotoda K, Obata H, Hayashi N, Hisamitsu T. Clinical observations during a relatively early stage of hepatocellular carcinoma, with special reference to serum alphafetoprotein levels. *Gastroenterology* 1975; **69**(1): 226-234.
14. Yoshiki T, Itoh T, Shirt T, Noro T, Tomino Y, HamaJima TI. Primary intracranial yolk sac tumor immuno- fluorescent demonstration of alpha-fetoprotein synthesis, *Cancer* 1976; **37**: 2343-2348.
15. De Mees C, Laes JF, Bakker J, Smits J, Hennuy B, Van Vooren P, et al. Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol Cell Biol* 2006; **26**(5): 2012-2018.
16. Soloff MS, Swartz SK, Pearlmutter AF, Kithier K. Binding of 17beta-estradiol by variants of alpha-fetoprotein in rat amniotic fluid. *Biochim Biophys Acta* 1976; **427**(2): 644-651.
17. Uriel J, De Nechaud B, Dupiers M. Estrogen-binding properties of rat, mouse and man fetospecific serum proteins. Demonstration by immuno-autoradiographic methods. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; **46**(3): 1175-1180.
18. Nishi S, Matsue H, Yoshida H, Yamaoto R, Sakai M. Localization of the estrogen-binding site of alpha-fetoprotein in the chimeric human-rat proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88** (8): 3102-3105.
19. Savu L, Benassayag C, Vallette G, Christeff N, Nunez E. Mouse alpha 1-fetoprotein and albumin. A comparison of their binding properties with estrogen and fatty acid ligands. *J Biol Chem* 1981; **256**(18): 9414-9418.
20. Uriel J, Bouillon D, Aussel C, Dupiers M. Alpha-fetoprotein: the major high-affinity estrogen binder in rat uterine cytosols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73**(5):1452-1456.
21. Mizejewski GJ. New insights into AFP structure and function: potential biomedical applications, In: Mizejewski GJ and Porter IH (eds), *Alpha-Fetoprotein and Congenital Disorders*. Orlando, Academic Press, 1985. PP: 5-34.
22. Kohler KD. The pre- and post natal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int Rev Cytol* 1991; **131**: 1-57.
23. Toran-Allerand CD. On the genesis of sexual differentiation of the general nervous system: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of alpha-fetoprotein. *Prog Brain Res* 1984; **61**: 63-98.
24. McCusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; **211**: 1294-1302.
25. Gillespie JR, Uversky VN. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview *Biochim. Biophys Acta* 2000; **1480**: 41-56.
26. Aoyagi Y, Ikenaka T, Ichida F. Copper (II)-binding ability of human alpha-fetoprotein, *Cancer Res* 1978; **38**: 3483-3486.
27. Torres JM, Laborda J, Naval J, Darracq N, Calvo M, Mishal Z, et al. Expression of alpha-fetoprotein receptors by human T-lymphocytes during blastic transformation. *Mol Immunol* 1989; **26**(9): 851-857.
28. Belanger L, Waite WI, Daguiard F, Larochelle J, Dufour D. The effect of AFP on the in vitro lymphocyte response. In: Masseyeff R, (ed.) *Alpha-Fetoprotein, Institut National De La Sante' Et De La Recherche Me'Dicale* 1974: 423-440.

29. Tomasi TB Jr. Structure and function of alpha-fetoprotein. *Annu Rev Med* 1977; **28**: 453-465.
30. Bellini C, Bonacci W, Paridu E, Serra G. Serum alpha-fetoprotein in newborns. *Clin Chem* 1998; **44**(12): 2548-2450.
31. Goraya SS, Smythe PJ, Walker V. Plasma alpha -feto protein concentration in preterm neonates, *Ann Clin Biochem* 1985; **22**: 650-652.
32. Obiekwe BC, Malek N, Kitau MJ, Chard T. Maternal and fetal alphafetoprotein (AFP) level at term, *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985; **64**: 251-253.
33. Dierks Tan JS, Zehfuss I, Taubert HD. The significance of alpha-feto-protein (AFP) and human chorionic gonodotrophi (HCG) during the first half of pregnancy. 1982; **42**(1): 29-34.
34. Ikonen RS, Lindgren J, Niemi E, Sorto AE, Seppälä M, Rouslahti E. Alpha- fetoprotein level in neonatal hyper bilirubinemia. *Acta Paediatr Scand* 1980; **69**(1): 59-63.
35. Riskin A, David M, Peskin B, Tamir A, Vafsi O, Leibovitz Z, etal. The role of umbilical cord alpha fetoprotein as a screening tool for neonatal hyperbilirubinemia. *Am J Perinatol* 2004; **21**(2): 93-98.
36. National committee for clinical laboratory standards. National Evaluation protocols for interference testing. *Evaluation Protocol* 1986; **7**(6): 13.
37. National committee for clinical laboratory standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices, approved guideline, 2nd ed. Wayne 2001; EP5-A.
38. Lee PI, Chang MH, Chen DS, Lee CY. Serum alpha-fetoprotein levels in normal infants: a reappraisal of regression analysis and sex difference. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; **8**(1): 19-25.